[文章编号] 1007-385X(2007)02-0110-05

· 论 著 ·

肺癌抑制性抗体及其抗原的鉴定

冉宇靓,胡 海,陈立钊,遇 珑,孙立新,杨治华(中国医学科学院 中国协和医科大学 肿瘤研究所 细胞生物学及分子生物学研究室,北京 100021)

[摘 要] **目的**: 鉴定抑制肺癌细胞生长的功能性单克隆抗体 1E2 及其抗原,为治疗肺癌提供有潜力的靶向抗体治疗剂和分子靶位。**方法**: 采用活细胞荧光、MTT 细胞增殖实验、ELISA、动物体内治疗实验等方法检测鼠单克隆抗体 1E2 对人肺癌细胞增殖的抑制、单抗与癌细胞的结合部位、单抗的亚类和单抗对肺癌移植瘤的抑制,以 Western blotting 和 MALDI TOF 质谱方法鉴定该功能性单抗的抗原。**结果**: 单抗 1E2 能够与肺癌细胞 GLC82 和 NCI-H520 的细胞膜结合,在体外能够明显抑制肺癌细胞的增殖。动物实验表明单抗 1E2 能够抑制肺癌移植瘤的生长,抑制率达 49%。Western blotting 显示其抗原相对分子质量约 110 000,质谱鉴定该抗原为氨甲酰磷酸合成酶(carbamoyl-phosphate synthetase 1, CPS1)。**结论**: 单抗 1E2 能够在体内外抑制肺癌的生长,具有成为肺癌靶向治疗剂的潜力。该抗体识别的抗原 CPS1 可表达于肺癌细胞的细胞膜,可能是一个肺癌靶向治疗的新靶位。

[关键词] 肺癌; 功能性单克隆抗体; 抗原; 靶位; 靶向治疗
[中图分类号] R37 [文献标志码] A

A functional antibody targeting lung cancer and it's antigen

RAN Yu-liang, HU Hai, CHEN Li-zhao, YU Long, SUN Li-xing, YANG Zhi-hua (Department of Cellular Biology and Molecular Biology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

[**Abstract**] **Objective**: To identify a functional monoclonal antibody 1E2 against lung cancer and its antigen, so as to provide a candidate antibody drug and molecule target for the anti-lung cancer therapy. **Methods**: The inhibition of the lung cancer cells, binding with tumor cells, isotypes, and inhibition of implanted tumor growth of 1E2 monoclonal antibody were studied by immunofluorescence, ELISA, cell proliferation assay, and *in vivo* tumor treatment experiments. The corresponding antigen of 1E2 was identified by Western blotting and MALDI-TOF mass spectrometry. **Results**: The 1E2 antibody could recognize cell surface protein of lung cancer cell line GLC82 and HCI-H520 and obviously inhibited the lung cancer cell growth *in vivo*. Animal experiment revealed that 1E2 antibody significantly inhibited lung tumor growth by 49%. Western blotting revealed that the molecular weight of the antigen of 1E2 antibody was about 110 000. Mass fingerprint revealed this protein was carbamoyl-phosphate synthetase 1(CPS1). **Conclusion**: 1E2 monoclonal antibody can suppress lung tumor growth *in vitro* and *in vivo*; it might become a candidate drug for targeted lung cancer treatment. CPS1, the antigen of 1E2, locates on the membrane of lung cancer cells and it may become a novel molecule target for lung caner therapy.

[**Key words**] lung cancer; functional monoclonal antibody; antigen; target; targeting therapy
[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(2): 110-114]

肺癌是世界上发病率最高的恶性肿瘤之一[1]。在我国城市中其发病率和病死率均居首位。虽然近年来以手术、放化疗为主的综合治疗手段有了较大提高,但肺癌患者的 5 年生存率仍低于 15%[2]。靶向治疗是近年来肿瘤治疗领域取得的重大突破,美国 FDA 已批准多种靶向治疗药物用于临床,例如 Herceptin 和 Avastin 等单抗靶向药物用于乳腺癌和转移性结肠癌的治疗已在临床上取得了显著的疗效[3-4],为肿瘤治疗提供了一种全新的策略。目前肺癌靶向治疗的药物众多,但主要集中于两类分子靶位:表皮生长因子受体(epidermal growth factor re-

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(No. 30230150);国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(No. 2002CB513106)
[作者简介] 冉宇靓(1973-), 男, 重庆市人, 博士, 副研究员, 主要从事肿瘤免疫防治及抗体工程药物方面的研究
[通讯作者] 杨治华, Email: yang_zhihua_prof@ yahoo. com. cn

ceptor, EGFR)家族相关通路以及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体相关通路[5]。然而临床研究表明,仅仅针对这两类靶位治疗肺癌的疗效并不尽如人意,尚需要发现更多针对肺癌的有效治疗靶位[6]。本课题组采用本室建立的高通量筛选功能性单抗技术平台[7],研制获得了初步显示能在体内外抑制肺癌生长的小鼠功能性单克隆抗体 1E2(另文发表)。在此基础上,本研究深入探讨该单抗在体内外对肺癌的抑制作用,并鉴定其抗原,以期为肺癌治疗提供有潜在应用价值的新治疗靶位和抗体靶向治疗剂。

1　材料与方法

1.1　主要材料和试剂

肺癌细胞系 GLC82(肺腺癌)、NCI-H520(肺鳞癌)为本室保藏。6 周龄 BALB/c 小鼠购自中国药品生物制品检定所[实验动物合格证号:SCXK(京)2005-0004]。M199、1640、DMEM、IMEM 培养液均购自 Gibco BRL 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)为 Hyclone 公司产品;biotin-马抗小鼠 IgG 购自 Vector 公司;α-tublin 兔多抗为 Santa Cruz 公司产品;FITC 标记的羊抗兔购自 Vector 公司;Cy3 标记 avidin 购自 Jackson 公司;PVDF 膜由 Millipore 生产;DAPI 购自 Sigma 公司;单抗亚类检测试剂盒由 Southern Biotech 公司生产;Western bloting 试剂购自普利莱公司。蛋白酶切用胰酶购于罗氏公司,质谱鉴定用 α-氰基-4-羟基肉桂酸购于 Sigma 公司。小鼠单克隆抗体 1E2 按文献[7]采用人肺癌组织细胞免疫方法制备,其上清可抑制 GLC82 细胞增殖,其腹水可抑制裸鼠 GLC82 移植瘤的生长。

1.2　细胞培养

杂交瘤细胞采用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养;肺癌细胞系 GLC82 和 NCI-H520 采用含 10% FBS 的 1640 培养液培养。

1.3　活细胞免疫荧光检测单抗与肺癌细胞的结合状态

按 9 000/孔肿瘤细胞接种于 96 孔培养板,37 ℃、5% CO_2 孵箱培养 2 d。细胞约 70% 汇合后,用 PBS 洗涤每孔中的细胞后加入一定浓度的待测抗体,室温孵育 1 h,用含 1% BSA 的 PBS 洗涤 5 次,每次 5 min;加入 60 μl 含 0.5 μg/ml biotin 标记马抗鼠二抗或 60 μl 含 0.5 μg/ml FITC 标记羊抗兔抗体,室温孵育 30 min,用含 1% BSA 的 PBS 洗涤 5 次,每次 5 min;加入 60 μl 1∶1 000 稀释的 Cy3-Avidin,室温孵育 30 min 后,PBS 洗涤 5 次,每次 5 min;最后用含 10 μg/ml DAPI 的 50% 甘油 50 μl 封片观察。

1.4　ELISA 检测单抗类型及亚类

采用 Southern Biotech 的单抗亚类 ELISA 检测试剂盒测定待测单抗的类型,操作按照试剂盒说明书进行。

1.5　MTT 法检测 1E2 对 GLC82 细胞增殖的影响

在 96 孔板采用 MTT 法检测 1E2 抗体对 GLC82 细胞增殖的影响。分为 PBS 对照组、正常鼠 IgG(100 μg/ml)组、1E2 高剂量(100 μg/ml)组、1E2 低剂量(20 μg/ml)组,每组每次检测设 3 个平行孔,每孔在 0 d 时接种细胞数为 1 000 个,在 0、3、5、7、9 d 分别每天检测 1 次。

1.6　体内抑瘤实验

将 BALB/c 裸鼠分为抗体治疗组(高剂量组、低剂量组)、PBS 治疗组、正常鼠 IgG 治疗对照组,每组 6 只。将人肺癌细胞系 GLC82 按每只小鼠 1×10^6 细胞皮下接种。接种后 5 d(已能扪及肿瘤时),开始腹腔注射纯化抗体进行治疗。每次每只小鼠注射的高剂量为 200 μg,低剂量为 50 μg。治疗第 1 周,每天 1 次,连续 5 d,以后每周 2 次。20 d 时处死小鼠,测瘤重,按抑制率 =(1- 治疗组平均瘤重/治疗组平均瘤重)% 的公式计算肿瘤生长抑制率。

1.7　Western blotting 检测 1E2 抗体的抗原表达

样品经 SDS-PAGE 分离后,采用半干式电转移法将蛋白从凝胶转移到硝酸纤维素膜上。丽春红染色确定蛋白转移到膜上并标出相对分子质量的位置。将膜放在 5% 的脱脂奶(溶于 PBS, pH 7.4)中 4 ℃封闭过夜,与 10 μg/ml 一抗 37 ℃下孵育 1 h,PBS 清洗后与 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(1∶1 000)37 ℃下孵育 1 h。用 TBS 洗膜 4 次后用 ECL 发光试剂盒显影。

1.8　肺癌抗原的提取和质谱鉴定

用含有 1% TritonX 100 的 PBS 从 GLC82 细胞中提取细胞蛋白,用 1E2 抗体在提取的细胞蛋白中进行免疫沉淀,免疫沉淀复合物在 SDS-PAGE 分离后进行银染显色。

从银染的 PAGE 胶中挖取 Western 显影的相应蛋白条带,脱色后胶块真空离心干燥。以 25 mmol/L的碳酸氢氨为溶剂配制 3.75 μg/ml 的胰酶溶液。将胰酶溶液约 15 μl 加入样品,37 ℃消化 16 h。酶解后在离心管中加入 5% TFA 溶液 120 μl,40 ℃反应 1 h,吸取上清液。再加入 2.5% TFA/50% CAN 溶液 120 μl 30 ℃反应 1 h。吸取上清液,合并后冰冻干燥。向样品管中加入 5 μl 0.

5% TFA 溶液溶解,取出 0.5 μl 作基质辅助激光解吸附/电离飞行时间质谱鉴定(MALDI-TOF),采用 α-氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)作为基质。肽指纹谱匹配在 Mascot 数据库中进行(http://www. matrixscience. com/cgi/index. pl)。

1.9　统计学处理

小鼠移植瘤瘤重以($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用 t 检验分析,所有统计学处理采用 SPSS 软件(SPSS 公司),软件版本号为 13.0。

2　结　果

2.1　1E2 单抗与肺癌细胞膜蛋白的反应

用兔抗 α-tublin 抗体作为细胞膜是否被通透的对照,采用活细胞免疫荧光法检测 1E2 杂交瘤克隆上清与 2 种肺癌细胞系 GLC82 和 NCI-H520 的活细胞反应。结果发现,1E2 抗体能够与肺癌细胞系 GLC82 和 NCI-H520 活细胞的细胞膜反应(图 1),而 α-tublin 为阴性,未见绿色荧光。由于对照 α-tublin 的免疫荧光阳性则说明细胞膜已经被通透,抗 α-tublin 的抗体分子进入了细胞;而 α-tublin 为阴性,说明细胞没有被通透,抗体无法进入细胞内。因此,该结果表明该 1E2 是与细胞膜上而非胞质的蛋白结合,说明 1E2 抗体所识别的抗原位于人肺癌细胞的细胞膜上。

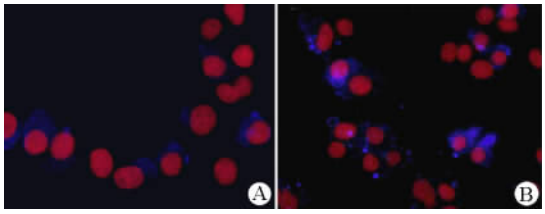

图 1　活细胞免疫荧光检测 1E2 抗体与肺癌细胞 NCI-H520 和 GLC82 的反应(×200)

Fig. 1　Immunofluorescence of viable NCI-H520 and GLC82 cells detected by 1E2 antibody (×200)

A: NCI-H520 cells; B: GLC82 cells.
Nucleolus were blue stained by DAPI

2.2　1E2 单抗对肺癌细胞 GLC82 增殖的抑制

采用肿瘤细胞增殖 MTT 测定法,测定 1E2 抗体对肺癌细胞系 GLC82 生长的抑制。结果显示,1E2 抗体对 GLC82 细胞生长有显著的抑制。图 2 显示 1E2 单抗对肺癌细胞增殖抑制的细胞生长曲线。

2.3 功能性单抗亚类的鉴定

采用单抗亚类检测试剂盒检测 1E2 单抗的亚类,结果显示 1E2 单抗为小鼠 IgG1 型。

2.4 抗肺癌单抗 1E2 体内对肺癌移植瘤生长的抑制

用 1E2 抗体进行了体内抑瘤试验。在单抗治疗后 20 d(接种肿瘤后 25 d)处死动物,收获各组的肿瘤,称瘤重,计算各组的平均瘤重。高剂量和低剂量 1E2 抗体对肿瘤瘤重的抑制率分别为 49.4% 和 40.1%($P < 0.05$)。由此表明,1E2 抗体在体内能显著抑制人肺癌移植瘤的生长(图 3)。

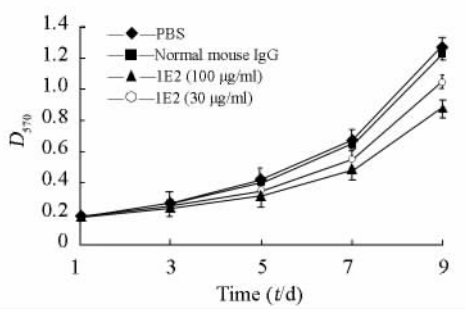

图 2　1E2 抗体在体外抑制 GLC82 肺癌细胞的增殖

Fig. 2　Inhibition of 1E2 monoclonal antibody on proliferation of lung cancer cell GLC82 *in vitro*

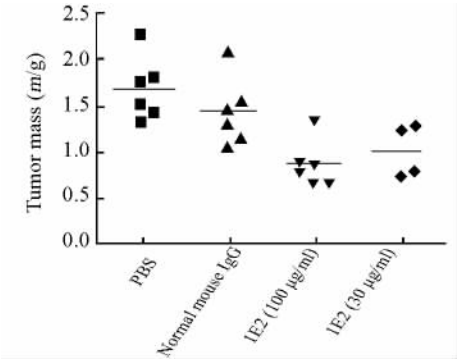

图 3　1E2 抗体治疗后肺癌移植瘤质量的改变

Fig. 3　Mass change of implanted lung cancer after 1E2 antibody treatment

2.5　1E2 抗原的鉴定

用 Western blotting 测定了 1E2 抗体所识别的抗原的相对分子质量,如图 4A,1E2 抗原相对分子质量约 110 000。从免疫沉淀的蛋白电泳中挖取相应蛋白条带,进行了 MALDI-TOF 的肽指纹图谱鉴定(图 4B)。经 Mascot 数据库对比,鉴定 1E2 抗原为氨甲酰磷酸合成酶(carbamoyl-phosphate synthetase 1, CPS1),匹配分值为 79,匹配可信度远远高于 64 分的 95% 可信分值。

3　讨　论

肿瘤的靶向治疗是近年来肿瘤治疗领域的一个

重大突破。由于靶向治疗的药物通常仅与其相应的靶位结合，通过直接影响其靶位分子的功能，或本身带有的物理或化学的效应分子来达到杀伤或抑制目标细胞的药效[8]。由于作用靶位明确，药物通常具有很高的选择性，可以有效地杀伤或抑制目标细胞，而对于正常组织细胞不产生或仅产生较小的毒性作用[9]。靶向治疗已成功应用于多种肿瘤的治疗，取得了令人瞩目的疗效。如赫赛汀（抗 HER2 人源化单抗）治疗乳癌[10]、美罗华（抗 CD20 人源化单抗）治疗淋巴瘤[11]、格列卫（酪氨酸激酶抑制剂）治疗慢性粒细胞白血病、胃肠道间质瘤[12]、阿瓦斯汀（抗 VEGF 人源化抗体）治疗大肠癌[13]等。目前常用的化疗药物对于肿瘤的复发转移疗效一直差强人意，而已有的研究表明新型靶向药物对那些化疗不敏感肿瘤的复发和转移也具有较好的疗效。在临床上使用的靶向药物中，抗 HER2 的抗体类药物赫赛汀能够明显地抑制乳腺癌患者的肺转移[14]，抗血管类药物贝伐单抗能够抑制结肠癌患者的复发和转移[13]。

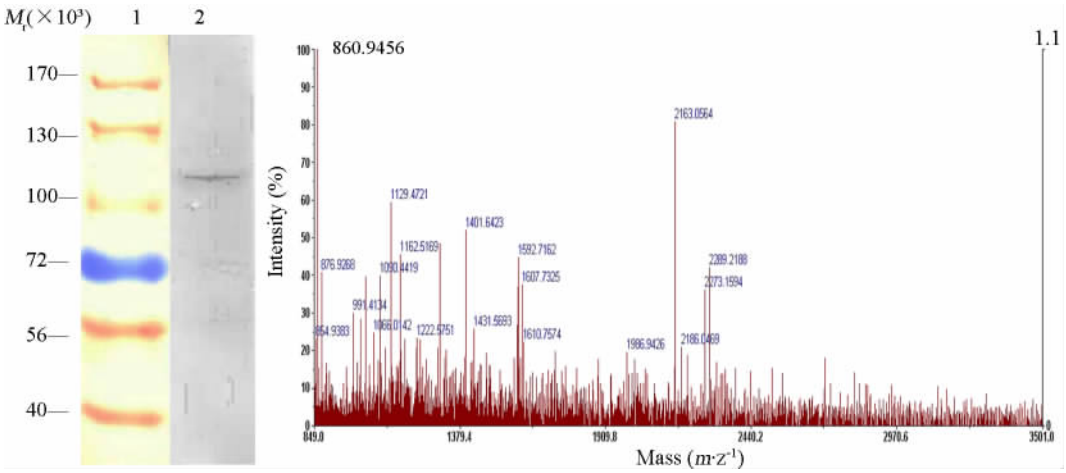

图 4　1E2 抗体的抗原鉴定结果

Fig. 4　Identification of corresponding antigen of 1E2 antibody

A: Western blotting shows the molecular mass of the antigen of 1E2 antibody is about 110 000; 1: Marker; 2: 1E2;
B: Mass fingerprint of the antigen of 1E2 antibody, identified by MALDI-TOF

肿瘤靶向药物的研究重点是在于靶标的寻找。对于肿瘤靶标的要求主要有以下方面：（1）特异性，即靶标在人体内的分布主要集中于肿瘤细胞或肿瘤相关的各种支持细胞如肿瘤血管、肿瘤间质细胞，或者是肿瘤的基质。从药效学的观点来说即是相应的靶向药物能容易地达到肿瘤组织，并聚集于肿瘤组织；而在正常组织中分布和滞留很少[15]。（2）功能性，即靶标对于肿瘤的生长转移具有重要作用，而对于正常组织细胞的生理功能不产生严重的影响。（3）膜蛋白。由于目前抗体分子仍然是优选的靶向药物，而抗体分子不能够进入细胞只能和细胞膜蛋白结合；另外，药物不需进入细胞即发挥作用，将能大大减少药物毒性作用。因此，膜蛋白是肿瘤靶向治疗的优选靶位。

肺癌的治疗仍然是个世界性的难题，目前肺癌仍然没有很好的靶向治疗药物和分子靶标。本研究证实，功能性单抗 1E2 能够与肺癌细胞系 NCI-H520 和 GLC82 的细胞膜结合，表明该抗体的抗原分布于细胞膜，且在肺癌的腺癌和鳞癌细胞均有分布。1E2 在体内外对肺癌的生长均有明显的抑制作用。质谱鉴定的结果表明，1E2 的抗原蛋白是 CPS1。CPS1 是参与尿素循环的最重要的酶之一[16]，通常定位于细胞线粒体膜，在胞质中也有分布。然而最新研究表明，在肿瘤发生过程中许多胞内分子会异常定位到细胞膜上[17]。因此，推测氨甲酰磷酸合成酶也可能是由于类似的原因，在肿瘤细胞中从线粒体膜上转位到了细胞膜上。CPS1 有多种异构体，有报道显示其多表达于肝和肠上皮细胞[18]，但某些异构体仅表达于睾丸，并可能参与精子发生的过程[19]。目前已经有文献报道，CPS1 可能参与了肝癌的发生发展[20]；在胃癌中也存在特异的高表达，被认为可能是胃癌的标志物之一[21]；但尚未有报道其作为膜蛋白的表达分布情况。本研究结果显示了采用抗体干扰或抑制肺癌细胞表面 CPS1 的功能对于肺癌细胞的体内外生长均具有显著的抑制作用，提示了 CPS1 可能通过某种未知的机制参与了肺癌的发生或发展。我们将进一步对 CPS1 基因的组织表达谱和作用机制进行详细的研究，以明确该基因

作为肺癌靶向治疗分子靶位的潜力。

总之,本研究证实了抗肺癌功能性单克隆抗体1E2体内外抑制肺癌生长的活性,采用质谱技术鉴定其抗原为CPS1,为肺癌的靶向治疗提供了一种新的候选靶分子,并为研究新的肺癌靶向治疗性抗体药物提供了实验依据。

[参考文献]

[1] Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe 2004[J]. Ann Oncol, 2005, 16(3): 481-488.

[2] Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, *et al*. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(8): 675-690.

[3] Morris SR, Carey LA. Trastuzumab and beyond: New possibilities for the treatment of HER2-positive breast cancer[J]. Oncology (Williston Park). 2006, 20(14): 1763-1771.

[4] Shih T, Lindley C. Bevacizumab: An angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies[J]. Clin Ther, 2006, 28(11): 1779-17802.

[5] Cascone T, Gridelli C, Ciardiello F. Combined targeted therapies in non-small cell lung cancer: A winner strategy[J]? Curr Opin Oncol, 2007, 19(2): 98-102.

[6] Ramalingam S, Belani CP. Recent advances in targeted therapy for non-small cell lung cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11(2): 245-257.

[7] Zhang Y, Ran Y, Yu L, *et al*. Monoclonal antibody to human esophageal cancer endothelium inhibits angiogenesis and tumor growth[J]. Anticancer Res, 2006, 26(4B): 2963-2970.

[8] Old LJ. Immunotherapy for cancer[J]. Sci Am, 1996, 275(3): 136-143.

[9] Scott, AM, Cebon J. Clinical promise of tumour immunology[J]. Lancet, 1997, 349(S2): 19-22.

[10] Baselga J, Norton L, Albanell J, *et al*. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts[J]. Cancer Res, 1998, 58(13): 2825-2831.

[11] Foran JM, Rohatiner AZS, Cunningham D, *et al*. European phase Ⅱ study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma[J]. J Clin Oncol, 2000, 18(2): 317-323.

[12] Kantarjian H, Melo JV, Tura S, *et al*. Chronic myeloid leukemia: Disease biology and current and future therapeutic strategies[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2000, 90-109.

[13] Fernando NH, Hurwitz HI. Targeted therapy of colorectal cancer: Clinical experience with bevacizumab[J]. Oncologist, 2004, 9(S1): 11-18.

[14] Tokuda Y, Suzuki Y, Ohta M, *et al*. Compassionate use of humanized anti-HER2/neu protein, trastuzumab for metastatic breast cancer in Japan[J]. Breast Cancer, 2001, 8(4): 310-315.

[15] Scott, AM, Welt S. Antibody-based immunological therapies[J]. Curr Opin Immunol, 1997, 9(5): 717-722.

[16] Adcock MW, O'Brien WE. Molecular cloning of cDNA for rat and human carbamyl phosphate synthetase I[J]. J Biol Chem, 1984, 259(21): 13471-13476.

[17] Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, *et al*. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating legends[J]. Cancer Cell. 2004, 6(3): 275-284.

[18] Nishiyama K, Berstein G, Oda T, *et al*. Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding human liver serine-pyruvate aminotransferase[J]. Eur J Biochem, 1990, 194(1): 9-18.

[19] Huo R, Zhu H, Lu L, *et al*. Molecular cloning, identification and characteristics of a novel isoform of carbamyl phosphate synthetase I in human testis[J]. J Biochem Mol Biol, 2005, 38(1): 28-33.

[20] Kinoshita M, Miyata M. Underexpression of mRNA in human hepatocellular carcinoma focusing on eight loci[J]. Hepatology, 2002, 36(2): 433-438.

[21] Liu TH, Li DC, Gu CF, *et al*. Carbamyl phosphate synthetase I. A novel marker for gastric carcinoma[J]. Chin Med J (Engl). 1989, 102(8): 630-638.

[收稿日期] 2006-12-20 [修回日期] 2007-03-10
[本文编辑] 王 莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准GB 3358-93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 $\bar{x}$,不用大写X,也不用Mean或M;(2)标准差用英文小写 s,不用SD;(3)标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$,不用SE;(4)t 检验用英文小写 t;(5)F 检验用英文大写 F;(6)卡方检验用希文小写 χ^2;(7)相关系数用英文小写 r;(8)自由度用希文小写 ν;(9)样本数用英文小写 n;(10)概率用英文大写 P;(11)以上符号 $\bar{x}$、s、$s_{\bar{x}}$、t、F、χ^2、r、ν、n、P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)